

医药与日化原料

新型功能性植物盐美白功效的体外评价

严雅丽¹, 周沫希¹, 姜春鹏², 赵奕竹², 张英^{1*}

(1. 浙江大学 生物系统工程与食品科学学院 食品科学与营养系, 浙江 杭州 310058; 2. 上海绿瑞生物科技有限公司, 上海 201203)

摘要: 对松盐、梅盐与竹盐的美白功效进行了体外评价, 分别研究其对体外酪氨酸酶的单酚酶和二酚酶活性的抑制作用, 并以熊果苷为阳性对照, 采用体外培养的 B16 黑色素瘤细胞模型探究其对胞内酪氨酸酶活性、细胞增殖及迁移的影响。结果表明, 植物盐元素组成丰富, 且水溶液呈碱性, 松盐、竹盐、梅盐对酪氨酸酶活性表现出极显著的浓度依赖的抑制作用 ($p < 0.01$), 当这 3 种植物盐水溶液的质量浓度为 50.0 g/L 时, 它们对酪氨酸酶单酚酶抑制率分别为 97.1%、94.8%、48.2%, 对二酚酶的抑制率均高于 92.0%; 与原盐相比, 5.0 g/L 的植物盐对 B16 细胞生长抑制作用不明显, 但会抑制其横向迁移; 植物盐对 B16 细胞胞内酪氨酸酶活性抑制作用优于熊果苷, 5.0 g/L 的梅盐组的细胞内酪氨酸酶活性仅有 8.76%, 抑制效果好于松盐、竹盐。所研究的植物盐可以抑制酪氨酸酶的活性, 且对 B16 细胞无附加毒性, 显示出作为一种无机酪氨酸酶抑制剂的潜力, 在人体美白方面有较好的潜在应用价值。

关键词: 功能性植物盐; 美白作用; 酪氨酸酶; B16 细胞; 抑制剂; 日化原料

中图分类号: TS974.1; TS36 文献标识码: A 文章编号: 1003-5214 (2020) 05-1002-08

In vitro evaluation of whitening effects of new functional plant salts

YAN Yali¹, ZHOU Moxi¹, JIANG Chunpeng², ZHAO Yizhu², ZHANG Ying^{1*}

(1. Department of Food Science and Nutrition, College of Biosystems Engineering and Food Science, Zhejiang University, Hangzhou 310058, Zhejiang, China; 2. Shanghai Emerald Biotech Co., Ltd., Shanghai 201203, China)

Abstract: The whitening effects of pine salt, plum salt and bamboo salt were evaluated *in vitro*, and their inhibitory effects on the activities of tyrosinase monophenolase and diphenolase were studied *in vitro*, respectively. The model of B16 melanoma cells was used to explore the effects of salts on the activity of intracellular tyrosinase, cell proliferation and migration, and arbutin was used as a positive control. The results showed that these plant salts were rich in elemental composition and alkaline in aqueous solution. And pine salt, bamboo salt and plum salt showed extremely significant concentration-dependent inhibition of tyrosinase activity ($p < 0.01$). When the mass concentration of the three kinds of plant salt solution was 50.0 g/L, their corresponding inhibition rates of tyrosinase monophenolase were 97.1%, 94.8% and 48.2%, respectively, and those of diphenolase were higher than 92.0%. Compared with the original salt, 5.0 g/L plant salts had no obvious inhibitory effect on the growth of B16 cells, but they inhibited the lateral migration. The inhibitory effects of these plant salts on the intracellular tyrosinase activity of B16 cells were better than that of arbutin, and the intracellular tyrosinase of 5.0 g/L plum salt group was only 8.76%, and the inhibition effect was better than those of pine salt and bamboo salt. These plant salts can inhibit the activity of tyrosinase, and have no additional toxicity to B16 cells, showing the potential as an inorganic tyrosinase inhibitor, and possess very good potential application value in human whitening.

Key words: functional plant salts; whitening effect; tyrosinase; B16 cells; inhibitor; cosmetic materials

收稿日期: 2019-11-13; 定用日期: 2020-01-17; DOI: 10.13550/j.jxhg.20191075

基金项目: 广东省重点研发项目 (2019B020212001)

作者简介: 严雅丽 (1996—), 女, 硕士生。联系人: 张英 (1961—), 女, 教授, E-mail: yzhang@zju.edu.cn。

竹盐是一种传统的植物盐,它起源于中国,民间常用竹盐来治疗消化不良、止血消毒等^[1]。竹盐的传统生产方式是以普通海盐为原料,将其装入新鲜竹筒中,用黄泥封口,在土窑中进行煅烧。在800~1400℃高温作用下,竹筒有机质燃烧,竹筒中的一些无机成分进入海盐中,从而影响盐的性质。一次煅烧后竹盐呈灰白色,反复煅烧9次后可以得到精品紫竹盐。目前,关于竹盐的研究主要集中在其健康功效,例如:消炎、抗过敏、抗氧化、抗癌等^[2-4],而美白方面的研究较少。新型功能性植物盐是指从植物体中提取的有效成分与普通海盐经过特殊烤制工艺后形成的含有丰富矿物质的一种功能盐,它对人体微量元素平衡、机能调节及健康具有一定促进作用,它的生产方式与传统竹盐不同,可利用不同的植物提取物种类、通过不同的配方工艺得到具有不同特性的植物盐^[5],如:利用松提取物或梅提取物与盐在高温下共同烤制得到松盐与梅盐。

酪氨酸酶是一种金属氧化还原酶,是黑色素生成的主要限速酶。酪氨酸和多巴都可以在酪氨酸酶的作用下氧化生成多巴醌,多巴醌可通过两条独立的路径最后生成黑色素^[6]。酪氨酸酶广泛分布于动植物、微生物及人体中,在微生物及动物体内一般称为酪氨酸酶,而在植物体中称为多酚氧化酶。酪氨酸酶的活性影响着果蔬的褐变和人体B16细胞黑色素的形成^[7],对果蔬保鲜、加工及人体肤色有着重要影响。

目前,酪氨酸酶抑制剂的研究主要集中在天然提取物和有机合成物方面,其中竹叶黄酮、肉豆蔻提取物、柑橘纯露等天然产物对酪氨酸酶活性有显著的抑制作用^[8-10],一些人工合成的黄酮衍生物、查尔酮衍生物等也能高效抑制酪氨酸酶活性^[11-12]。酪氨酸酶抑制剂的研究大多集中于有机物,而对无机抑制物研究甚少。苟琳等^[13]发现,硫代硫酸钠能显著抑制酪氨酸酶活性,IC₅₀为8.80 mmol/L,推测其与酶结合后可能导致酶分子构象的改变,从而降低了酶的活性。邢蕊^[14]研究了多金属氧酸盐对蘑菇酪氨酸酶的抑制作用和机理,发现它们对酪氨酸酶均有明显的抑制效果,同时过渡金属取代的磷钼酸盐PMo₁₁Cu和PMo₁₁Fe还可以抑制B16细胞的增殖、胞内酪氨酸酶活性及黑色素合成。除此之外,PMo₁₁Fe还可以显著地减缓莲藕切片的褐变度,抑制多酚氧化酶(PPO)的活性,增强过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性,对果蔬保鲜有一定作用。

竹盐具有长久的食用习惯,一些泡菜制品和酱油常添加竹盐作为辅料。与普通食盐相比,竹盐具有更加丰富的元素组成,其中钾、镁等元素含量较

高^[15]。本课题组通过专利方法^[5]得到了新型植物盐松盐、梅盐、竹盐,并且将其作为研究对象,探究它们对酪氨酸酶单酚酶及二酚酶活性的抑制效果,并且观察其对B16黑素瘤细胞各项指标的影响,包括增殖率、胞内酪氨酸酶活、细胞迁移和细胞周期变化,为植物盐作为一种体外及胞内的无机酪氨酸酶抑制剂提供理论和实验依据,为植物盐在美白中的应用提供参考。

1 实验部分

1.1 材料、试剂与仪器

植物功能盐,本课题组参考文献^[5]方法,利用竹、梅、松的提取物与普通海盐,通过高温烤制后得到紫色的竹盐、蓝色的梅盐以及粉色的松盐;竹叶提取物(竹叶黄酮),浙江圣氏生物科技有限公司(安吉);松针提取物,陕西清雅生物科技有限公司;梅枝提取物,杭州尤美特生物科技有限公司;原盐,日晒海盐,江苏金桥制盐有限公司;烤盐,经高温(850℃)烤制过的日晒海盐;韩国紫竹盐,仁山竹盐有限责任公司; β -熊果苷、Triton X-100、二甲基亚砜(DMSO),AR,上海阿拉丁试剂有限公司。

小鼠B16黑素瘤细胞,中国科学院上海细胞生物所;RPMI-1640培养液,美国Gibco公司;胎牛血清,美国ThermoFisher公司;胰蛋白酶、青霉素-链霉素溶液、磷酸缓冲液(PBS),AR,杭州科易生物科技有限公司;DNA含量检测试剂盒(细胞周期)、左旋多巴(L-DOPA)、酪氨酸、酪氨酸酶(25 kU, ≥ 500 U/mg),AR,北京索莱宝科技有限公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT,染色液质量浓度为5 g/L),北京雷根生物技术有限公司。

QSH-VTF-1400T管式电阻炉,上海全硕电炉有限公司;PB-10标准型酸度计,德国赛多利斯集团;Eon酶标仪,美国BioTek公司;LDZX-50KBS立式高压灭菌锅,上海申安医疗器械厂;CP-ST50A型二氧化碳培养箱,长沙长锦科技有限公司;SW-CJ-F超净工作台,上海博迅实业有限公司;CKX41倒置显微镜,日本OLYMPUS光学工业株式会社;BD FACSCalibur流式细胞仪,美国BD公司。

1.2 方法

1.2.1 新型功能性植物盐的制备

新型竹盐的制备:将竹叶黄酮提取物与原盐按质量比20:100混合后放入刚玉坩埚,置于管式电阻炉中,在常压下以10℃/min的速率升温,升至950℃后保温2h,然后取出坩埚自然降温冷却,得到紫色的新型竹盐。

新型松盐的制备:将松针提取物与原盐按质量

比 20 : 100 混合后放入刚玉坩埚, 置于管式电阻炉中, 在常压下以 10 °C/min 的速率升温, 升至 1000 °C 后保温 3 h, 然后取出坩埚自然降温冷却, 得到粉红色的松盐。

新型梅盐的制备: 将梅枝提取物与原盐按质量比 20 : 100 混合后放入刚玉坩埚, 置于管式电阻炉中, 在常压下以 10 °C/min 的速率升温, 升至 900 °C 后保温 2 h, 然后以 10 °C/min 的速率升温至 1300 °C 后停止加热, 取出坩埚自然降温冷却, 得到蓝色的梅盐。

1.2.2 新型功能性植物盐溶液 pH 的测定

利用纯水分别配制 2.0、10.0 及 50.0 g/L 的植物盐及原盐、烤盐水溶液, 澄清后取上清液, 采用酸度计进行溶液 pH 的测定。

1.2.3 体外酪氨酸酶抑制率测定

以酪氨酸作为酪氨酸酶单酚酶活性测定的底物, 以 L-DOPA 作为酪氨酸酶二酚酶活性测定的底物, 参考 HUANG 等^[16]的方法进行酪氨酸酶的活性测定。首先, 将原盐、烤盐、松盐、竹盐、梅盐用 PBS 溶液配成 2.0、10.0、50.0、100.0 g/L 的盐溶液, 按表 1 中反应液 A1、A2、A3、A4 组成依次准确吸取不同浓度的样品溶液、0.1 mol/L pH 6.8 的 PBS 溶液和 1.0 mmol/L 的酪氨酸或 L-DOPA, 充分混匀后放入 25 °C 水浴锅孵育 10 min, 然后加入相应的 870 U/mg 酪氨酸酶溶液, 10 min 后测定各反应溶液在 475 nm 处的吸光值, OD_{A1} 表示反应液 A1 的吸光值, 以此类推。抑制率按下式计算^[16]:

$$\text{酪氨酸酶单酚酶或二酚酶抑制率}/\% = [1 - (\text{OD}_{A3} - \text{OD}_{A4}) / (\text{OD}_{A1} - \text{OD}_{A2})] \times 100$$

表 1 体外酪氨酸酶活测定中的反应液组成 (mL)

Table 1 Composition of reaction solution in *in vitro* tyrosinase activity assay (mL)

反应液成分	A1	A2	A3	A4
样品溶液	0	0	0.3	0.3
PBS 缓冲溶液	0.4	0.5	0.1	0.2
底物 (酪氨酸/L-DOPA)	0.5	0.5	0.5	0.5
酪氨酸酶	0.1	0	0.1	0

1.2.4 B16 细胞增殖率的测定

采用 MTT 法测定 B16 细胞增殖率^[17]。以原盐为阴性对照, β -熊果苷和韩国竹盐作为阳性对照。选择对数生长期的 B16 细胞接入 96 孔板, 贴壁后弃去原培养基, 加入配好的含有 2.5、5.0、7.5 和 10.0 g/L 的原盐、松盐、竹盐、梅盐、 β -熊果苷和韩国竹盐的培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 48 h。在测定前 4 h 取出, 每孔加入 20 μ L MTT (5 g/L) 溶

液, 放入 CO₂ 培养箱中在 37 °C、5% CO₂ 环境中孵育 4 h, 然后弃去培养基和 MTT, 向各孔中加入 150 μ L DMSO 以溶解残留的 MTT-甲贖结晶, 振荡 10 min, 以不加样品培养的细胞作为对照, PBS 作为空白。用酶标仪测定各孔在 570 nm 下的吸光值 (OD₅₇₀)。细胞增殖率按下式计算^[17]:

$$\text{细胞增殖率}/\% = [(\text{OD}_{570}(\text{实验}) - \text{OD}_{570}(\text{空白})) / (\text{OD}_{570}(\text{对照}) - \text{OD}_{570}(\text{空白}))] \times 100$$

1.2.5 B16 细胞内酪氨酸酶活性的测定

采用多巴氧化法对 B16 细胞内酪氨酸酶活性进行测定^[18]。将 B16 细胞接入 96 孔板, 贴壁后弃去原培养基, 加入含有各样品的培养基进行培养 48 h。将作用时间已到的各组细胞倾去培养液, 用 PBS 缓冲液洗 2 次, 每孔加入质量分数 1% 的 Triton X-100 水溶液 50 μ L, 然后迅速放入 -80 °C 冰箱内冻存 30 min, 取出后在 37 °C 下融化, 使细胞完全破裂, 每孔加入 10 μ L L-DOPA 溶液 (10 g/L), 以不加样品培养的细胞作为对照, PBS 作为空白, 37 °C 下反应 2 h, 用酶标仪测定各孔在 475 nm 处的吸光值 (OD₄₇₅)。细胞内酪氨酸酶活性按下式计算^[18]:

$$\text{细胞内酪氨酸酶活性}/\% = [(\text{OD}_{475}(\text{实验}) - \text{OD}_{475}(\text{空白})) / (\text{OD}_{475}(\text{对照}) - \text{OD}_{475}(\text{空白}))] \times 100$$

1.2.6 B16 细胞迁移测定

选择对数生长期的 B16 细胞, 调整细胞浓度至 4 \times 10⁵ 个/mL, 取 2 mL 加入 6 孔板, 待细胞在底部覆盖 60% 左右时, 弃去原培养基, 取 10 μ L 移液枪头在每孔底部画直线 (一次操作), 用 PBS 轻轻洗去滑落的细胞, 再用 5.0 g/L 的原盐、松盐、竹盐、梅盐、熊果苷配制的培养基继续培养 48 h, 在显微镜下观察细胞的生长状态与迁移情况, 以不加样品培养的细胞作为对照^[19]。

1.2.7 B16 细胞周期的测定

在 6 孔板中使 B16 细胞贴壁后, 加入含有 5.0 g/L 各试样的培养基进行培养, 每组 3 个平行样品并设置空白对照组, 分别培养 48 h。培养结束后收集细胞, 用 PBS 清洗后去掉上清液, 加入冷的体积分数 70% 乙醇溶液 500 μ L, 固定过夜, 然后离心并吸取残留的乙醇。在细胞沉淀中加入 RnaseA 溶液 100 μ L, 重悬细胞, 37 °C 水浴 30 min, 再加入 400 μ L PI 染色液混匀, 4 °C 避光孵育 30 min, 将单细胞悬液转移至流式管中上机检测, 记录激发波长 488 nm 处红色荧光。

1.3 数据处理

采用 Origin9 处理实验数据, 计算结果以平均值 \pm 标准差 (Mean \pm SD) 表示, 使用 SPSS 21 单因素方差分析 ANOVA 中的 Duncan 进行显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 新型功能性植物盐的元素含量与水溶液 pH

表2为新型功能性植物盐的各元素含量。由表2可知, 新型植物盐具有丰富的元素组成, 且不同种类的植物盐各元素含量不同, 植物盐中钾、锰

元素含量普遍高于原盐及烤盐, 重金属铅的含量显著低于原盐。烤盐大部分元素含量均低于原盐, 说明高温烤制过程除去了一些微量元素; 竹盐的镁、铁、锰元素显著高于其他种类的盐, 且重金属铅含量最低; 梅盐的钾、铝含量显著高于其他种类的盐, 但钙含量最低。

表2 植物盐的元素含量 (mg/kg)
Table 2 Elemental content of plant salts (mg/kg)

样品	钠 ^①	钾 ^①	钙 ^②	镁 ^③	铁 ^④	铝 ^⑤	锰 ^⑥	铅 ^⑦
原盐	3.99×10 ⁵	66.40	1.62×10 ³	128.00	33.00	32.40	2.32	3.63
烤盐	4.22×10 ⁵	69.90	1.14×10 ³	54.00	9.56	14.80	2.01	0.15
松盐	4.23×10 ⁵	4.43×10 ³	1.46×10 ³	108.00	34.20	22.60	6.84	0.43
竹盐	4.32×10 ⁵	7.94×10 ³	1.11×10 ³	872.00	184.00	16.00	20.20	0.05
梅盐	4.13×10 ⁵	3.16×10 ⁴	692.00	168.00	26.60	51.40	18.00	0.21

①参照 GB 5009.91—2017 第一法测定; ②参照 GB 5009.92—2016 第一法测定; ③参照 GB 5009.241—2017 第一法测定; ④参照 GB 5009.90—2016 测定; ⑤参照 GB 5009.182—2017 第一法测定; ⑥参照 GB 5009.242—2017 第一法测定; ⑦参照 GB 5009.12—2017 第一法测定。

传统竹盐的水溶液呈碱性, 2.0~50.0 g/L 的新型植物盐水溶液的 pH 列于表3。

表3 植物盐水溶液的 pH
Table 3 pH of different plant salt samples

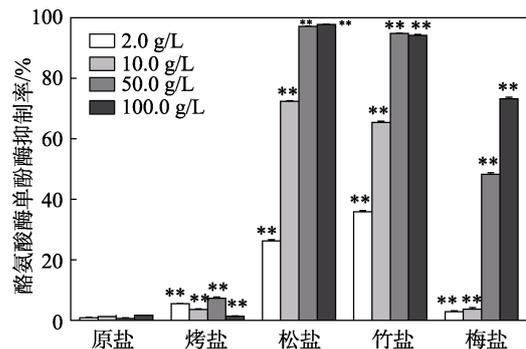
样品种类	ρ (试样) / (g/L)		
	2.0	10.0	50.0
原盐	5.76±0.06 ^d	5.99±0.01 ^d	7.48±0.07 ^d
烤盐	6.99±0.02 ^e	9.29±0.02 ^e	9.79±0.03 ^e
松盐	9.35±0.01 ^b	10.11±0.01 ^b	10.42±0.02 ^b
竹盐	10.54±0.04 ^a	11.09±0.01 ^a	11.39±0.01 ^a
梅盐	10.62±0.05 ^a	11.10±0.01 ^a	11.35±0.03 ^a

注: 不同字母表示在相同浓度下差异显著 ($p < 0.05$), $n=6$ 。

由表3可知, 原盐水溶液呈中性偏酸性, 而经过高温烤制后, 烤盐水溶液的 pH 显著上升, 质量浓度超过 10.0 g/L 时 pH 明显呈碱性; 松盐、竹盐、梅盐水溶液的 pH 随着浓度的上升显著增加, 且在研究范围内呈现显著的碱性 ($pH > 9$), 其中竹盐、梅盐水溶液在同一质量浓度下的 pH 相近, 且显著高于松盐。原盐与植物提取物在高温下共融后, 酸性物质燃烧挥发, 大量碱金属元素与 NaCl 共融或附着在其表面, 从而导致植物盐的 pH 显著升高。

2.2 植物盐对酪氨酸酶活性的抑制作用

当以酪氨酸为底物时, 酪氨酸酶可将其催化为多巴并进一步生成黑色素, 该过程主要是发挥了酪氨酸酶单酚酶的活性^[20]。各种盐溶液对酪氨酸酶单酚酶活性的抑制作用如图1所示。



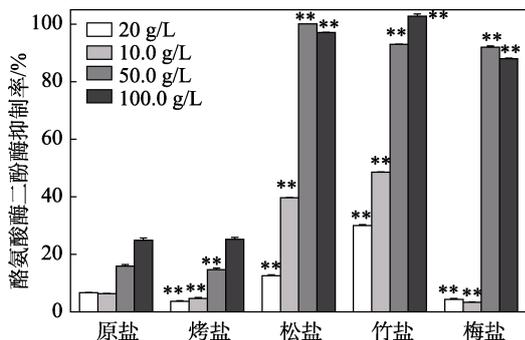
**表示与原盐比较, 实验组存在极显著差异 ($p < 0.01$), $n=3$

图1 植物盐水溶液对体外酪氨酸酶单酚酶的抑制率
Fig. 1 Inhibition rates of tyrosinase monophenolase by different plant salt solutions *in vitro*

由图1可知, 原盐在 2.0~100.0 g/L 范围内均显示对酪氨酸酶无明显抑制作用。烤盐在 50.0 g/L 时对酪氨酸酶影响最大, 但抑制率不高于 10%。松盐与竹盐对酪氨酸酶活性影响显著, 并且呈浓度效应关系, 在 2.0~50.0 g/L 时, 随着盐浓度的增加, 对酪氨酸酶的抑制率增大, 2.0 g/L 时抑制率分别为 26.2%和 35.8%; 50.0 g/L 时抑制率分别达到 97.1%和 94.8%, 100.0 g/L 时抑制率基本不变。相比于松盐和竹盐, 梅盐在低浓度 (2.0、10.0 g/L) 时对酪氨酸酶抑制率较低, 当质量浓度为 50.0 g/L 时抑制率迅速增加到 48.2%, 100.0 g/L 的梅盐溶液对酪氨酸酶的抑制率为 73.2%, 效果略差于相同浓度的松盐、竹盐溶液。

当 L-DOPA 作为底物时, 酪氨酸酶可将其催化为多巴醌并进一步生成黑色素, 该过程主要是发挥

了酪氨酸酶二酚酶的活性^[21]。各种盐溶液对酪氨酸酶二酚酶的抑制率如图 2 所示。



**表示与原盐比较, 实验组存在极显著差异 ($p < 0.01$), $n = 3$

图 2 植物盐溶液对体外酪氨酸酶二酚酶的抑制率

Fig. 2 Inhibition rates of tyrosinase diphenolase by plant salt solutions *in vitro*

由图 2 可知, 与对酪氨酸酶单酚酶抑制率相比, 原盐和烤盐对酪氨酸酶二酚酶抑制率明显增强, 并且有一定的浓度效应关系, 但最大抑制率不超过 30%。松盐、竹盐对酪氨酸酶二酚酶的抑制与对单酚酶的抑制效果相似, 高浓度 (50.0、100.0 g/L) 的梅盐溶液的二酚酶抑制率与相同浓度的松盐和竹盐溶液差别不大, 松盐、竹盐、梅盐质量浓度 50.0 g/L 时对二酚酶抑制率分别可达 99.9%、93.0%、92.0%。植物盐与原盐相比, 钾、锰等金属元素含量较多, 可能会对酪氨酸酶的蛋白质结构有一定影响; MUNJAL 等^[22]发现, 随着反应液的 pH 由 7.0 增加到 8.5, 酪氨酸酶活性从 90%降低到 30%左右, 因此, 推测植物盐使得反应溶液变为碱性从而抑制了酪氨酸酶的活性。

2.3 植物盐对 B16 细胞增殖活性的影响

黑色素是由黑色素细胞产生的, 一般来说抑制黑色素细胞的增殖可以减少黑色素的生成^[23]。小鼠 B16 黑色素细胞在不同浓度的样品中的增殖率如表 4 所示。由表 4 可知, B16 细胞在熊果苷的作用下其增殖率约为 70%, 且在研究范围内无明显变化; 质量浓度 2.5 g/L 以上的各种盐溶液均会抑制 B16 细胞的生长, 并且随着盐浓度的增加, 细胞增殖率降低; 5.0 g/L 以上植物盐对细胞增殖的抑制作用均优于熊果苷; 7.5 g/L 以上的盐浓度会严重影响细胞的生长。在低质量浓度 (2.5、5.0 g/L) 范围内, 松盐、竹盐、梅盐以及韩国竹盐中的 B16 细胞的增殖率均不低于原盐, 因此与原盐相比, 植物盐对 B16 细胞没有明显的额外的细胞毒性, 并且 5.0 g/L 的松盐、竹盐、梅盐中细胞的增殖率远大于原盐, 说明这几种植物盐对盐环境的 B16 细胞有一定的保护作用, 可能是植物盐中重金属铅含量较低, 且含有丰富的微量元素, 从而对细胞的生长起到了保护与促进作用。

表 4 植物盐对 B16 细胞增殖活性的影响 (增殖率, %, $\bar{X} \pm SD$)

Table 4 Effect of plant salts on the proliferation activity of B16 cells (proliferation rate, %, $\bar{X} \pm SD$)

样品种类	ρ (试样) / (g/L)			
	2.5	5.0	7.5	10.0
原盐	77.91±0.73 ^c	25.57±0.37 ^c	19.58±0.74 ^{bc}	5.26±0.51 ^d
松盐	80.02±0.98 ^d	45.71±0.78 ^c	17.48±0.88 ^d	7.77±0.88 ^c
竹盐	89.72±0.78 ^a	65.45±0.85 ^b	19.98±0.61 ^b	9.68±0.49 ^b
梅盐	83.01±0.73 ^c	36.49±1.01 ^d	19.42±0.64 ^{bc}	7.85±0.51 ^c
韩国竹盐	86.89±1.21 ^b	25.89±0.61 ^c	18.53±0.37 ^c	9.71±0.24 ^b
熊果苷	72.49±0.37 ^f	71.44±0.28 ^a	68.85±0.37 ^a	72.01±0.85 ^a

注: 不同字母表示在相同浓度下差异显著 ($p < 0.05$), $n = 6$ 。

2.4 植物盐对 B16 细胞内酪氨酸酶活性的影响

酪氨酸酶是 B16 细胞合成黑色素的关键限速酶, 其酶活是黑色素生成的重要影响因素, 是衡量功能因子美白功效的重要指标^[24], B16 细胞在各试样作用下胞内酪氨酸酶活性见表 5。

表 5 植物盐对 B16 细胞内酪氨酸酶活性的影响 (胞内酪氨酸酶活性, %, $\bar{X} \pm SD$)

Table 5 Tyrosinase activity of B16 cells under different samples (Intracellular tyrosinase activity, %, $\bar{X} \pm SD$)

样品种类	ρ (试样) / (g/L)		
	2.5	5.0	7.5
原盐	42.96±0.50 ^d	11.49±0.25 ^c	2.10±0.10 ^d
松盐	60.34±0.43 ^a	32.76±0.43 ^b	11.70±0.10 ^b
竹盐	56.90±0.43 ^c	32.47±0.25 ^b	11.74±0.17 ^b
梅盐	31.03±0.43 ^c	8.76±0.25 ^d	1.18±0.20 ^c
韩国竹盐	42.96±0.50 ^d	11.55±0.15 ^c	4.68±0.07 ^c
熊果苷	57.90±0.50 ^b	46.70±0.50 ^a	38.36±0.43 ^a

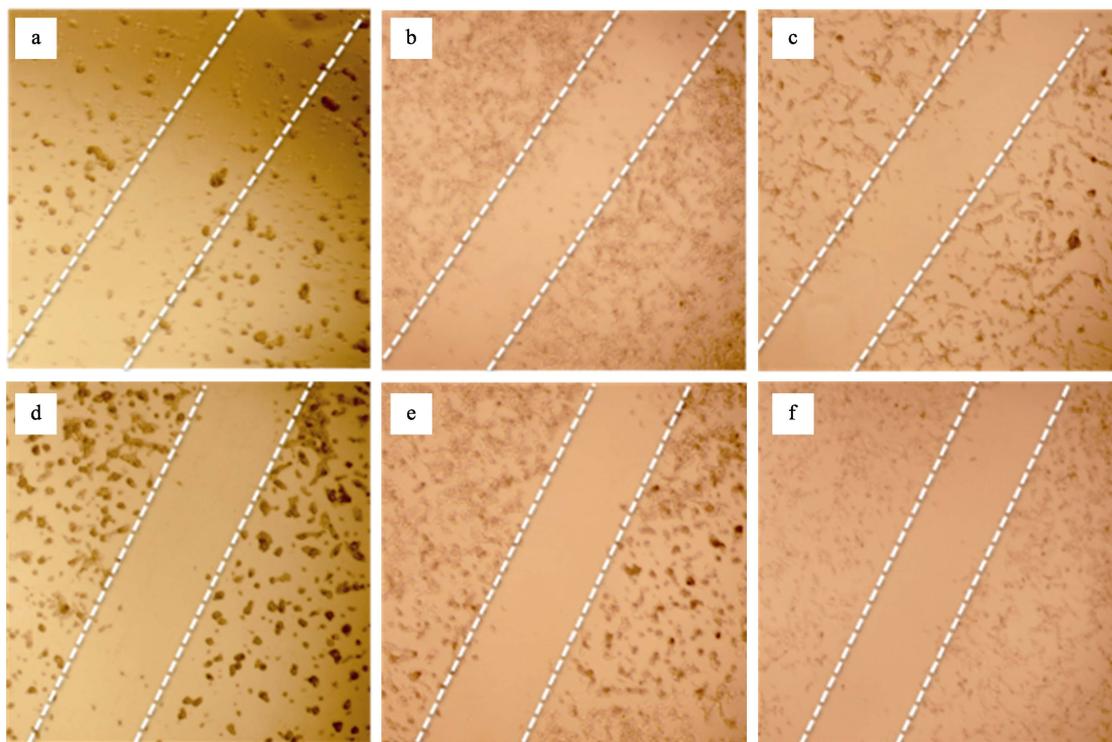
注: 不同字母表示在相同浓度下差异显著 ($p < 0.05$), $n = 6$ 。

由表 5 可知, 在研究浓度范围内, 各试样对 B16 细胞的酪氨酸酶活性均有一定的抑制作用, 酪氨酸酶活性均显著降低, 且呈一定的浓度效应关系。与原盐相比, 松盐、竹盐、韩国竹盐各组细胞酪氨酸酶活性均较高, 说明原盐对 B16 细胞内酪氨酸酶的抑制作用强于这 3 种植物盐, 而梅盐组在每个浓度下细胞酪氨酸酶活性都最小, 5.0 g/L 的梅盐组的细胞内酪氨酸酶活性仅有 8.76%, 说明梅盐可以显著降低 B16 细胞内酪氨酸酶活性, 且效果优于原盐和阳性对照组熊果苷, 可能是因为梅盐中的钾、铝元素含量丰富, 且钙含量较低, 影响了胞内酪氨酸酶的活性。植物盐对胞内外酪氨酸酶活性影响的差异可能是因为植物盐无法直接作用于 B16 细胞内的酪氨酸酶, 而是通过对细胞的不同作用, 调节细胞生长与蛋白表达从而影响酪氨酸酶的活性。

2.5 植物盐对 B16 细胞的迁移作用

肿瘤细胞的重要特征是在增殖过程中进行

扩散转移^[25], 可以通过其迁移度来判断其扩散能力, B16 细胞在各试样作用下的迁移情况见图 3。



a—正常; b—原盐; c—熊果苷; d—松盐; e—竹盐; f—梅盐

图 3 5.0 g/L 的各试样对 B16 细胞迁移的影响

Fig. 3 Effect of different samples (5.0 g/L) on the migration of B16 cells

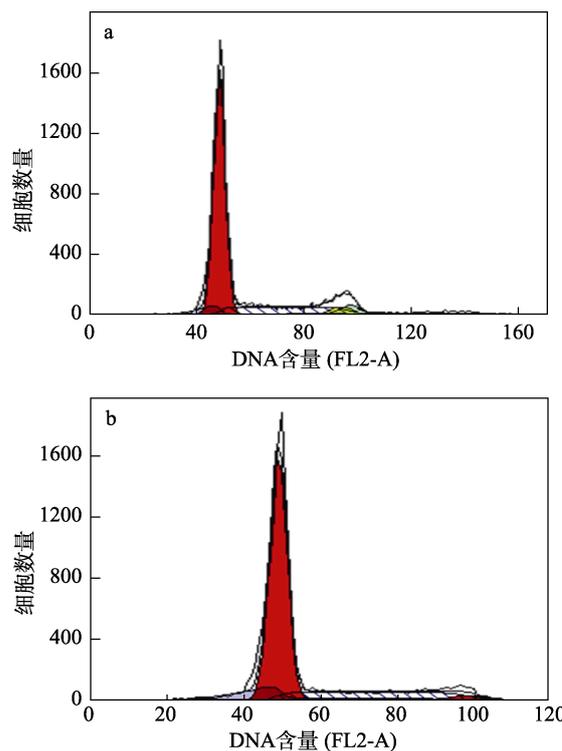
由图 3 可知, 正常组 (a) 的 B16 细胞在培养 48 h 后划线区域基本愈合, 说明其迁移能力很强。当受试物为 5.0 g/L 时, 原盐 (b) 作用的 B16 细胞在划线区只有部分细胞进入, 说明原盐对细胞迁移有一定的抑制作用。松盐 (d)、竹盐 (e)、梅盐 (f) 作用的细胞中, 划线区基本没有细胞进入, 说明这 3 种植物盐可以显著抑制 B16 细胞的横向转移, 且效果强于原盐。熊果苷 (c) 对 B16 细胞的迁移率也有一定抑制作用, 但其效果不如植物盐。

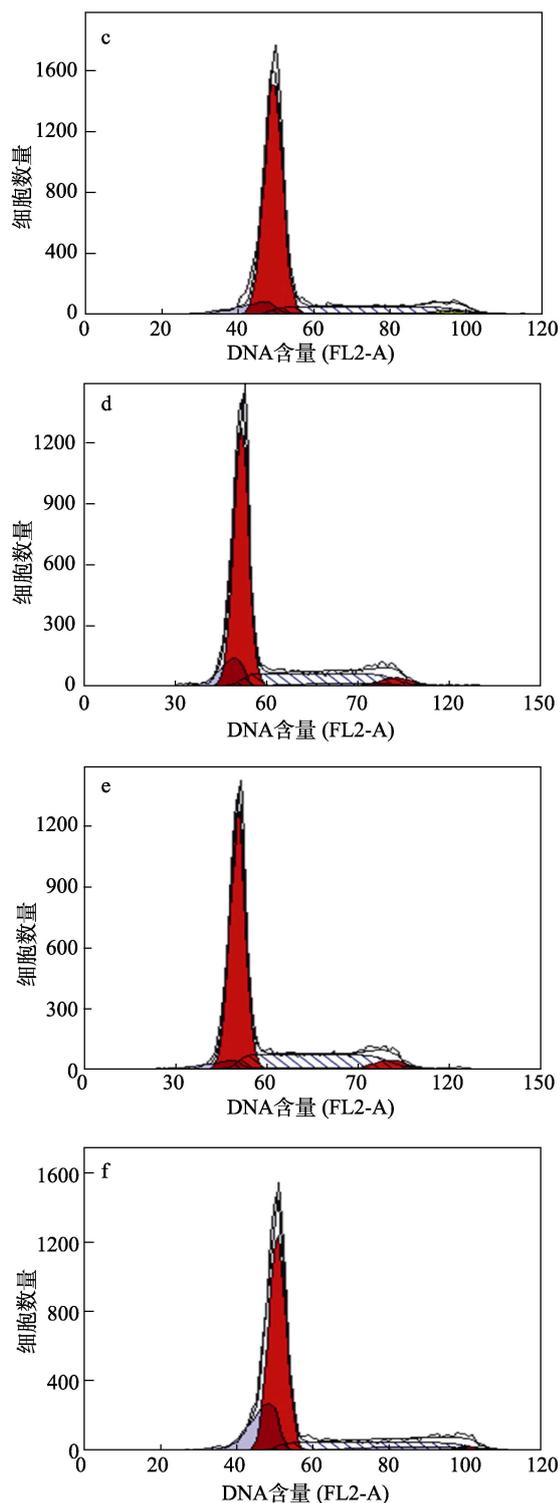
2.6 植物盐对 B16 细胞周期的影响

细胞周期是指由细胞分裂结束到下一次细胞分裂结束所经历的过程, 共分为 4 个阶段: G0/G1 期 (DNA 合成前期)、S 期 (DNA 复制期)、G2 期 (DNA 复制完成到有丝分裂开始前)、M 期 (细胞分裂开始到结束)^[26]。不同周期的细胞中 DNA 含量不同, 利用荧光染料 PI 将细胞 DNA 染色, 并在流式细胞仪中检测荧光强度, 即可研究细胞在不同周期阶段的分布, 了解细胞的增殖情况, 结果见图 4 和表 6。

由图 4 和表 6 可知, 原盐、熊果苷组与正常组细胞在 G0/G1 期和 S 期分布差异较小, 而松盐、竹盐与梅盐组在 S 期与 G2/M 期分布比例明显增加, G0/G1 期分布较少。S 期与 G2/M 的总和代表了细胞在 DNA 复制和有丝分裂过程的比例, 可以表示细胞

的增殖能力。结果显示, 松盐、竹盐组细胞增殖能力较好, 梅盐组次之, 其余各组增殖能力均无明显变化。MTT 结果显示, 各受试物对 B16 细胞群的增





a—正常; b—原盐; c—熊果苷; d—松盐; e—竹盐; f—梅盐

图 4 5.0 g/L 各试样对 B16 细胞周期的影响

Fig. 4 Effect of different samples (5.0 g/L) on the cell cycle of B16 cells

殖均有一定抑制作用, 而细胞周期研究发现, 存活的细胞增殖能力较好, 推测受试物处理可能会引起部分细胞的死亡, 而对一部分耐受的细胞具有促进增殖的效果, 存活细胞生存状态良好, 说明植物盐在发挥美白作用时对细胞周期无不良影响。

表 6 B16 细胞在 5.0 g/L 试样质量浓度下的细胞周期分布(%, $\bar{X} \pm SD$)

Table 6 Effect of different samples (5.0 g/L) on the cell cycle of B16 cells (%, $\bar{X} \pm SD$)

受试物	G0/G1	S	G2/M
正常	75.22±0.86 ^b	21.34±0.17 ^{bc}	3.44±0.86 ^c
原盐	76.62±0.74 ^a	21.26±0.09 ^d	2.12±0.65 ^c
熊果苷	75.91±0.18 ^{ab}	21.10±0.27 ^{cd}	2.99±0.45 ^c
松盐	68.58±0.29 ^d	27.10±0.17 ^{ab}	4.32±0.26 ^a
竹盐	67.54±0.80 ^d	27.24±0.12 ^a	5.23±0.92 ^a
梅盐	72.10±0.87 ^c	23.03±0.83 ^a	4.86±0.27 ^b

注: 不同字母表示在相同细胞周期下差异显著($p < 0.05$), $n=6$ 。

3 结论

松盐、竹盐、梅盐 3 种新型功能性植物盐对体外酪氨酸酶的单酚酶活性及二酚酶活性均表现出显著的浓度依赖的抑制作用, 当质量浓度为 50.0 g/L 时, 松盐、竹盐、梅盐对酪氨酸酶单酚酶抑制率分别为 97.1%、94.8%、48.2%, 二酚酶抑制率分别达到 99.9%、93.0%、92.0%。植物盐对 B16 细胞增殖有一定的抑制作用, 且效果优于熊果苷, 但与原盐相比无明显细胞毒性。梅盐可以显著降低 B16 细胞内酪氨酸酶活性, 5.0 g/L 梅盐培养基中的 B16 细胞酪氨酸酶活性仅有 8.76%, 胞内酪氨酸酶抑制效果显著优于熊果苷。同时, 植物盐可以显著抑制 B16 细胞的横向迁移, 但并不通过影响细胞周期来抑制其增殖。植物盐中丰富的元素和其呈碱性的水溶液可能对酪氨酸酶及 B16 细胞产生影响。作为体外及胞内酪氨酸酶的无机抑制剂, 其抑制效果良好、安全性高, 可以考虑作为化妆品中的美白功能成分。同时, 盐本身具有一定的抑菌功能, 植物盐在皮肤微生态的平衡中可能发挥重要的作用, 因此在日化领域有较高的应用价值。

参考文献:

- [1] SHIN H Y, LEE E H, KIM C Y, *et al.* Anti-inflammatory activity of Korean folk medicine purple bamboo salt[J]. Immunopharmacology and Immunotoxicology, 2003, 25(3): 377-384.
- [2] SHIN H Y, NA H J, MOON P D, *et al.* Inhibition of mast cell-dependent immediate-type hypersensitivity reactions by purple bamboo salt[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2004, 91(1): 153-157.
- [3] ZHAO X, JUNG O S, PARK K Y. Alkaline and antioxidant effects of bamboo salt[J]. Journal of the Korean Society of Food Science & Nutrition, 2012, 41(9): 1301-1304.
- [4] ZHAO X, DENG X, PARK K, *et al.* Purple bamboo salt has anticancer activity in TCA8113 cells *in vitro* and preventive effects on buccal mucosa cancer in mice *in vivo*[J]. Experimental & Therapeutic Medicine, 2013, 5(2): 549-554.
- [5] ZHANG Y, CHEN L, ZHOU M X. Functional plant salt and preparation method and application: WO2020020182A1[P]. 2020-01-30.
- [6] LIU Y Y (刘圆圆), LIU Z H (刘振辉), ZHANG S C (张士璿).

- Biosynthesis of melanin and melanogenesis inhibitors[J]. Ludong University Journal(Natural Science Edition) (鲁东大学学报:自然科学版), 2016, 32(3): 236-242.
- [7] WANG Y L (王玉林), HE J F (何锦凤), WANG W M (王维民), *et al.* Production of skin melanin and whitening[J]. Detergent & Cosmetics (日用化学品科学), 2013, 36(2): 33-35.
- [8] ZHANG Y J (张宇婧), LI Y H (李云虹), JIANG C P (姜春鹏), *et al.* Assessment on skin care effect of the nanomaterial taking high purity C-glycoside flavonoids of bamboo leaf as leading material[J]. Fine Chemicals (精细化工), 2019, 36(7): 1401-1407.
- [9] PANEERCHELVAN S, LAI H Y, KAILASAPATHY K. Antioxidant, antibacterial and tyrosinase inhibiting activities of extracts from myristica fragrans houtt[J]. European Journal of Medicinal Plants, 2015, 8(1): 39-49.
- [10] LANTE A, TINELLO F. Citrus hydrosols as useful by-products for tyrosinase inhibition[J]. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 2015, 27: 154-159.
- [11] ZHENG Z P, ZHANG Y N, ZHANG S, *et al.* One-pot green synthesis of 1, 3, 5-triarylpentane-1, 5-dione and triarylmethane derivatives as a new class of tyrosinase inhibitors[J]. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, 2016, 26(3): 795-798.
- [12] AKHTAR M N, SAKEH N M, ZAREEN S, *et al.* Design and synthesis of chalcone derivatives as potent tyrosinase inhibitors and their structural activity relationship[J]. Journal of Molecular Structure, 2015, 1085: 97-103.
- [13] GOU L (苟琳), LU H (卢航), WANG X Y (王西瑶), *et al.* Inhibition of tyrosinase by sodium thiosulfate[J]. Journal of Xiamen University (Natural Science) (厦门大学学报: 自然科学版), 2014, 53(2): 263-266.
- [14] XING R (邢蕊). Functionality study of polyoxometalates as tyrosinase inhibitor[D]. Xiamen: Jimei University (集美大学), 2016.
- [15] YONG X J, HAENG R K, SO Y K, *et al.* Effects of mineral-rich salt intake on the serum and blood pressure of Dahl salt-sensitive rats[J]. Journal of Biomedical Research, 2013, 14(4): 212-219.
- [16] HUANG K F, CHEN Y W, CHANG C T, *et al.* Studies on the inhibitory effect of *Graptopetalum paraguayense* E. Walther extracts on mushroom tyrosinase[J]. Food Chemistry, 2005, 89(4): 583-587.
- [17] WEI X, DU Z Y, ZHENG X, *et al.* Synthesis and evaluation of curcumin-related compounds for anticancer activity[J]. European Journal of Medicinal Chemistry, 2012, 53(19): 235-245.
- [18] ZHU Y J, QIU L, ZHOU J J, *et al.* Inhibitory effects of hinokitiol on tyrosinase activity and melanin biosynthesis and its antimicrobial activities[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2010, 25(6): 798-803.
- [19] ZHAO B (赵波). Extraction of flavonoids from Sea Buckthorn and inhibitory effects on Human Prostate Cancer PC-3 cells *in vitro*[D]. Hangzhou: Zhengjiang University (浙江大学), 2018.
- [20] CHEN M J, HUNG C C, CHEN Y R, *et al.* Novel synthetic kojic acid-methimazole derivatives inhibit mushroom tyrosinase and melanogenesis[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2016, 122(6): 666-672.
- [21] CHEN Q X, SONG K K, WANG Q, *et al.* Inhibitory effects on mushroom tyrosinase by some alkylbenzaldehydes[J]. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry, 2003, 18(6): 491-496.
- [22] MUNJAL N, SAWHNEY S K. Stability and properties of mushroom tyrosinase entrapped in alginate, polyacrylamide and gelatin gels[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2002, 30(5): 613-619.
- [23] TAKAHASHI M, TAKARA K, TOYOZATO T, *et al.* A novel bioactive chalcone of morus australis inhibits tyrosinase activity and melanin biosynthesis in B16 melanoma cells[J]. Journal of Oleo Science, 2012, 61(10): 585-592.
- [24] MENG T X, IRINO N, KONDO R. Melanin biosynthesis inhibitory activity of a compound isolated from young green barley(*Hordeum vulgare* L.) in B16 melanoma cells[J]. Journal of Natural Medicines, 2015, 69(3): 427-431.
- [25] ALBERT G, ITTA B P, TAMAR P, *et al.* Tumor, metastasis and what's in between[J]. Harefuah, 2013, 152(1): 30-33, 58-59.
- [26] ZOU X Y (邹向阳), LI L H (李连宏). Cell cycle control and tumor[J]. International Journal of Genetics (国际遗传学杂志), 2006, 29(1): 70-73.

(上接第 946 页)

- [8] WANG R (王韧). Ropaque covering polymer [J]. Shanghai Building Materials (上海建材), 2003 (6): 25-26.
- [9] LI H (李辉), HU J Q (胡剑青), WANG F (王锋), *et al.* Progress in preparation of hollow core-shell microspheres with alkali swelling method[J]. Thermosetting Resin (热固性树脂), 2013, 28(1): 49-53.
- [10] CHOI S B, JANG T H, YOO J N, *et al.* Process for preparing emulsion polymers having a hollow structure: US 5618888[P]. 1997-04-08.
- [11] GUO S H. Process for making vinyl aromatic/allylic alcohol copolymers: US 5444141[P]. 1995-08-22.
- [12] BLANKENSHIP R M, FINCH W C, MLYNAR L, *et al.* Hollow sphere organic pigment for paper or paper coatings: US 6139961[P]. 2000-10-31.
- [13] BROWN W T. Opacifying particles and compositions formed therefrom: US 8716365[P]. 2014-05-06.
- [14] GUO H C (郭华超), DENG W (邓伟), YU W L (于伟莉). Preparation and size control of polymer hollow microspheres[J]. Polymer Materials Science and Engineering (高分子材料科学与工程), 2018, 34(5): 30-34.
- [15] CHEN J W (陈剑伟), ZHU M (朱明). Preparation of hollow polymer microsphere through alkali permeability swelling method[J]. China Coatings (中国涂料), 2012, 27(8): 41-43.
- [16] LI G A (李国安), ZHANG Z D (张增德), LI J M (李佳明), *et al.* Effect of shell crosslinking agent on the morphology of polymer hollow particles[J]. Chemical Engineer (化学工程师), 2017, 31(7): 5-7.
- [17] FANG Y J (方应军), DENG W (邓伟), ZUO H (左涵), *et al.* Preparation of hollow polymer particles and orthogonal experiment design for alkali post-treatment conditions[J]. Acta Polymerica Sinica (高分子学报), 2015(8): 927-932.
- [18] NIE D M (聂冬梅), DUAN T (段涛), XUE L (薛璐), *et al.* Influence of pH value and temperature on hollow polymer particles[J]. Polymer Materials Science and Engineering (高分子材料科学与工程), 2013, 29(2): 70-73.
- [19] OKUBO M, NAKAGAWA T. Preparation of micron-sized monodisperse polymer particles having highcrosslinked structures and vinyl groups by seeded polymerization[J]. Colloid Polymer Science, 1992, 270(9): 853-858.
- [20] CAO T Y (曹同玉), LIU Q P (刘庆普), HU J S (胡金生). Polymer emulsion synthesis principle, properties and Applied[M]. Chemical Industry Press (化学工业出版社), 2007: 19-28.
- [21] ROBERT M B, JAMES K B. Process for preparation polymer emulsion and polymers formed therefrom: US7803878B2[P]. 2010-09-28.
- [22] HE M J (何曼君), ZHANG H D (张红东), CHEN W X (陈维孝), Polymer physical[M]. Fudan University Press (复旦大学出版社), 2006: 107-114.
- [23] WEI D, WANG J, WANG M, *et al.* Preparation of bowl-like polymer particles *via* multi-step emulsion polymerization and alkali post-treatment[J]. Macromolecular Symposia, 2011, 297(1): 61-64.